

S/PRTS

107537449

JC17 Rec'd PCT/PTO 03 JUN 2005

5

Gegen hTERT gerichtete Polynucleotide und die Verwendung
dieser

10

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft Polynucleotide, die
15 gegen ein Gen einer katalytischen Untereinheit der humanen
Telomerase (hTERT) gerichtet sind sowie die Verwendung
dieser Polynucleotide zur Diagnose, Prophylaxe, Behandlung,
Verlaufskontrolle von mit Zellwachstum, -differenzierung
und/oder -teilung im Zusammenhang stehenden Krankheiten,
20 wie beispielsweise Tumorerkrankungen.

Es ist bekannt, dass die Replikation der Enden von
eukaryotischen Chromosomen spezialisierte Zellbestandteile
erfordert. Die Replikation eines linearen DNA-Stranges
25 erfolgt in der Regel in 5'-3'-Richtung. Durch die
Entfernung der zum äußeren 3'-Ende der chromosomalen DNA
komplementären RNA-Primer, die für die Replikations-
initiation essentiell sind, bleiben bei jeder
Replikationsrunde die 5'-Enden neusynthetisierter DNA-
30 Stränge unvollständig. Dadurch kommt es zu einer
fortschreitenden Verkürzung der Tochterstränge bei jeder
Replikationsrunde (End-Replikationsproblem) [Levy et al.].
Diese Verkürzung an den als Telomere bezeichneten

Chromosomenenden ist unter anderem für die Steuerung der Proliferationsfähigkeit und damit für die Alterung von Zellen verantwortlich [Harley]. Die Struktur dieser Telomere ist in zahlreichen lebenden Systemen untersucht.

5

Das Ribonukleoenzym Telomerase besitzt in einer Vielzahl von Organismen die Aufgabe, die Telomere proliferierender Zellen zu verlängern und zu stabilisieren, womit das End-Replikationsproblem nivelliert wird [Greider et al.]. Diese reverse Transkriptase besteht aus zwei essentiellen Untereinheiten: einer RNA-Komponente (hTR) und einer katalytischen Untereinheit (hTERT) [Beattie et al.].

Übereinstimmend mit der Beziehung zwischen Telomeren und der Telomerase sowie der Proliferationsfähigkeit der Zellen wurde in immortalisierten Zelllinien sowie in >85% der untersuchten Tumoren eine Telomerase -aktivität nachgewiesen [Kim et al.]. Diese korreliert mit der Expression der hTERT-Komponente, wie beim Harnblasenkarzinom gezeigt wurde [Ito et al.]. Weiterhin ist ein Zusammenhang zwischen dem hTERT-Expressionsniveau im Harnblasenkarzinom und dem klinischen Verlauf der Tumorerkrankung bekannt (de Kok et al.). Daher ist die humane Telomerase ein ideales Ziel für die Diagnose und Behandlung menschlicher Krankheiten, die mit zellulärer Proliferation im Zusammenhang stehen, wie beispielsweise Krebs. Verfahren zur Diagnose und Behandlung von Krebs und anderen mit der Telomerase assoziierten Krankheiten sind unter anderem offenbart in der US 5 489 508 oder US 5 645 986. Die Hemmung der Telomerase wurde als spezifische Möglichkeit zur therapeutischen Kontrolle von Tumorzellen

beschrieben. Wichtige Bemühungen, die Aktivität der
Telomerase im Zusammenhang von Krebserkrankungen zu
modifizieren, sind in der EP 666313, WO 97/37691, WO
99/50279, US 2002/0045588 A1 oder der WO 98/28442
5 offenbart. Derartige allgemeine Lehren offenbaren dem
Fachmann aber keine konkreten Lehren zum technischen
Handeln. Eine Substanz bzw. ein Molekül, das mit dem
gesamten für hTERT kodierenden Sequenzbereich wechselwirkt,
führt zwar dazu, dass die entsprechende Telomeraseaktivität
10 - beispielsweise in einer Zellkultur - reduziert wird,
derartige Substanzen eignen sich aber nicht zur Applikation
in Organismen, da sie in der Regel viel zu groß sind und
vom Immunsystem des betreffenden Organismus angegriffen und
zerstört werden. Darüber hinaus kann eine Vielzahl
15 unerwünschter Wechselwirkungen bzw. Nebenwirkungen
auftreten. Aufgabe der Erfindung war es daher, alternative
kompakte Moleküle bereitzustellen, die mit ausgewählten,
spezifischen Struktureinheiten, die die Telomerase
kodieren, einfach und effektiv inhibierend wechselwirken.

20

Die Erfindung löst dieses technische Problem durch die
Bereitstellung eines Polynucleotids, das gegen eine mRNA
der katalytischen Untereinheit der humanen Telomerase
(hTERT) gerichtet ist, wobei das Polynucleotid insbesondere
25 mit Primärstrukturen dieser hTERT-mRNA in zwei
Zielsequenzbereichen von 2176 bis 2250 und 2296 bis 2393
gemäß dem Gendatenbankeintrag AF 015950 spezifisch
interagiert. Die Zahlen repräsentieren - auch in folgenden
Abschnitten - die entsprechenden Nukleotidpositionen
30 innerhalb der hTERT-mRNA (Gesamtlänge 4015 Nukleotide). Die
Erfindung betrifft also die überraschende Lehre, dass gegen

tumorassoziierte abnorme hTERT-mRNA-Expressionsmuster sowie Telomeraseaktivitätsniveaus durch eine mögliche hTERT-Inhibition mit den erfindungsgemäßen Polynucleotiden vorgegangen werden kann. Diese Polynucleotide sind gegen
5 definierte hTERT-mRNA-Sequenzmotive im Bereich von 2000 bis 2500 gerichtet. Sie können biologische und/oder chemische Strukturen sein, die in der Lage sind, so mit dem Zielsequenzbereich zu interagieren, dass eine spezifische Erkennung / Bindung und Wechselwirkung bestimmt werden
10 kann. Beispiele für Polynucleotide können insbesondere Nukleinsäurekonstrukte und deren Derivate sein. Selbstverständlich ist es auch möglich, anstatt oder in Kombination mit den Polynucleotiden andere Erkennungsmoleküle zu verwenden, wie z. B. Antikörper, Lektine,
15 Affiline, Aptamere, Chelatoren und andere.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform interagiert das Polynucleotid spezifisch mit zwei Zielsequenzbereichen 2176 bis 2250 und 2296 bis 2393. Vorteilhafterweise ist in
20 diesen Sequenzbereichen eine besonders effiziente hTERT-Inhibition möglich. Bevorzugt sind ebenfalls kürzere Bereiche mit Veränderungen innerhalb dieser Zielsequenzen oder mit veränderten Randbereichen oder unterschiedlichen Derivatisierungen/Modifizierungen/Fusionen/Komplexierungen,
25 die auch mit anderen Erkennungsmolekülen wie Polynucleotiden kombiniert und/oder gekoppelt sein können.

Durch diese bevorzugten Zielsequenzbereiche ist es dem
30 Fachmann möglich, insbesondere sehr kleine und/oder kompakte Polynucleotid bereitzustellen, die im Wesentlichen

nicht mit anderen Strukturen, insbesondere immunologischen Abwehrstrukturen, innerhalb des Zellgewebes bzw. des Organismus interagieren oder von diesen angegriffen werden, sondern spezifisch mit dem Zielsequenzbereich der hTERT-mRNA interagieren können.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist vorgesehen, dass der Sequenzbereich oder das Erkennungsmolekül, insbesondere das Polynucleotid durch Addition, Amplifikation, Inversion, Missense-Mutation, Nonsense-Mutation, Punktmutation, Deletion und/oder Substitution modifiziert ist. Diese Modifikationen können beispielsweise beim Polynucleotid dazu führen, dass es mit einer höheren Avidität oder Spezifität an die mRNA der katalytischen hTERT-Untereinheit bindet. Es kann jedoch selbstverständlich auch vorgesehen sein, dass das Polynucleotid mit geringerer Spezifität oder Avidität bindet. Bei den Mutationen im hTERT-Sequenzbereich kann es sich im Sinne der Erfindung zum Beispiel um vererbare oder nicht vererbare Veränderungen handeln. Die Modifikationen können so beschaffen sein, dass sie direkt auf der mRNA-Ebene oder auf der DNA-Ebene detektierbar werden. Zu den Mutationen können beispielsweise auch Mutationen im Zusammenhang mit einer zytologisch sichtbaren Genom- und/oder Chromosomenmutationen zählen, die mit Veränderungen der hTERT assoziiert sind. Derartige Mutationen können dadurch entstehen, dass Teile des Chromosoms verloren gehen, verdoppelt werden, in umgekehrter Orientierung vorliegen oder auf andere Chromosomen übertragen werden. Selbstverständlich ist es auch möglich, dass die Mutation nur ein oder wenige

benachbarte Basenpaare betrifft, wie dies beispielsweise bei der Punktmutation der Fall ist. Geht beispielsweise ein Basenpaar in Form einer Deletion verloren oder wird ein Basenpaar zusätzlich, wie bei der Insertion, eingeschoben, so verschiebt sich das Leseraster des betroffenen Gens zu einer Leserastermutation. Bei der Substitutionsmutation im Sinne der Erfindung wird beispielsweise eine Base gegen eine andere ausgetauscht, wobei die daraus resultierenden Konsequenzen unterschiedlich sein können:

10

(a) Es kann beispielsweise ein Kodon in ein synonymes Kodon umgewandelt werden,

15

(b) oder die Mutation verändert die Kodonspezifität und führt damit zum Einbau anderer Aminosäuren bzw.

20

(c) durch die Mutation wird die Translation an einer bestimmten Stelle beendet, wobei die gebildeten hTERT-Fragmente inaktiv oder aktiv sein können.

25

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist das Polynucleotid ein Nukleinsäurekonstrukt. Nukleinsäurekonstrukte im Sinne der Erfindung können alle Strukturen sein, die im Wesentlichen auf Nukleinsäuren basieren oder deren aktives Zentrum im Wesentlichen auf Nukleinsäuren basiert. Das Polynucleotid kann Bestandteil von Komplexen oder Formulierungen sein, bestehend aus Lipiden, Kohlenhydraten oder Proteinen bzw. Peptiden, beispielsweise in Form einer Nanokapsel. Dieser Komplex bzw. diese Formulierung umfasst einen Bereich, der Nukleinsäuren enthält, die mit hTERT wechselwirken können. Dem Fachmann

30

sind verschiedene Möglichkeiten bekannt, derartige Konstrukte bereitzustellen.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist das
5 Nukleinsäurekonstrukt ein Antisense(AS)-Oligonukleotid (ON), ein DNAzym, ein Ribozym, eine siRNA und/oder eine Peptid-Nukleinsäure (PNA).

Bei AS-Konstrukten handelt es sich um synthetisch
10 hergestellte Moleküle, die eine selektive Inhibition der Biosynthese ausgewählter Proteine ermöglichen. Zum Einsatz kommen zum Beispiel ON, PNAs, Ribozyme, DNAzyme. Die AS-Wirkung beruht auf der sequenzspezifischen Hybridisierung der Konstrukte durch Watson-Crick-Basenpaarung mit der für
15 das zu reprimierende Protein kodierenden Ziel-mRNA, was über verschiedene Mechanismen zu einer Verhinderung der Proteinsynthese führt (Tab.1).

Tab. 1 AS-Effekte und ihre Wirkungsmechanismen

20 ss - "single stranded" (Einzelstrang)

Effekt	Mechanismus	Referenzen
Transkriptions-inhibition	Bindung der AS-Konstrukte an genomische DNA durch Hoogsten-Triplex-Bildung	[Moser et al.]
Modulation der RNA-Prozessierung	a) Blockierung von Spleißstellen führt zur Verhinderung des Spleißvorgangs b) Verhinderung der Polyadenylierung destabilisiert die mRNA c) Behinderung des mRNA-Transports ins Zytoplasma	[Kole et al., Crooke]

Hemmung der Translation	kompetitive Bindung des AS-Konstrukts an die Ziel-mRNA verhindert Initiations- bzw. Elongationsprozess	[Boiziau et al.]
Spaltung der Ziel-mRNA	a) selektiver Abbau des RNA-Stranges in RNA-DNA-Hybriden durch die Endonuklease RNase H b) Abbau von ss-RNA durch die Endonuklease RNase L nach Aktivierung durch 2',5'-Tetraadenylat-modifizierte ON c) durch Ribozyme/DNAzyme katalysierte, sequenz-spezifische Spaltung der Ziel-mRNA	[Crooke, Agrawal et al., Sun et al.]

Die Entwicklung von AS-ON als therapeutische Substanzen stellt neben verschiedenen anderen Anwendungsfeldern auch ein neues erfolgversprechendes Therapiekonzept für onkologische Erkrankungen dar [Tamm et al.]. Während es bei der konventionellen Chemotherapie zu einer unspezifischen Hemmung der Zellproliferation kommt, werden mit der AS-Therapie ganz gezielt solche mRNAs inaktiviert, die die molekulare Grundlage oder einen wesentlichen Bestandteil des entarteten, deregulierten Wachstums und der Tumorprogression darstellen sowie für die Inhibierung der körpereigenen Immunabwehr verantwortlich sein können.

AS-ON unterscheiden sich von anderen Therapeutika, wie Antikörpern, Toxinen oder Immuntoxinen dahingehend, dass es sich um relativ kleine Moleküle mit einem Molekulargewicht von üblicherweise etwa 5 kDa handelt. Die geringe Größe der AS-ON ermöglicht eine gute Gewebepenetration. Außerdem ist

bekannt, dass Tumorblutgefäße im Gegensatz zu Blutgefäßen normaler Gewebe für Substanzen in einem Größenbereich zwischen 4-10 kDa durchlässig sind. Das bedeutet, dass therapeutische AS-ON gezielt Tumorblutgefäße penetrieren
5 können. Ein weiterer Vorteil dieser Substanzen, zum Beispiel gegenüber Antikörpern, die nahezu ausschließlich gegen extrazelluläre Proteine wirksam sind, besteht darin, dass über die jeweilige Ziel-mRNA prinzipiell alle, also sowohl zytoplasmatische als auch kernlokalisierte sowie
10 membranständige Proteine angegriffen werden können.

Die gegen einen Nuklease-Angriff relativ resistenten Phosphothioat-AS-ON werden gegenwärtig in einer Reihe von klinischen Studien (Phase I-III) hinsichtlich ihres
15 Potentials als Anti-Krebs-Therapeutika evaluiert. Dabei werden in Tumoren überexprimierte Ziel-mRNA-Moleküle angegriffen.

Bei Verwendung der Phosphothioat-ON (PS-ON) wurde eine
20 Reihe von unerwarteten, so genannten "non-AS"-Effekten beobachtet, die zudem zu einer unspezifischen Hemmung des Zellwachstums führen können. Diese Effekte sind stark von der ON-Sequenz bzw. von bestimmten Sequenzmotiven abhängig und treten auf Grund der starken polyanionischen Ladung der
25 PS-ON auf, welche eine Bindung der PS-ON an lebenswichtige Proteine zur Folge haben kann. Die erwähnten negativen Effekte können insbesondere durch Verwendung von partiell phosphothioat-modifizierten AS-ON oder durch weitere Modifikationen, z.B. Einbau von Ribonukleotiden anstatt
30 Desoxyribonukleotiden, überwunden werden. Eine partielle endständige Modifizierung von ON-Konstrukten (bevorzugt 2

bis 5 Bindungen vom 3'- und 5'-Nukleinsäureterminus sind modifiziert) bietet eine erhöhte Stabilität im extra- und intrazellulären Milieu der Zielzellen (Schutz vor Abbau durch Exonukleasen), insbesondere bei einer Applikation in vivo. Ein positiver Nebeneffekt, der bei Verwendung der PS-ON beobachtet wurde, ist deren immunstimulatorische Wirkung, die bei einigen Tumoranwendungen durchaus einen möglichen Therapieerfolg unterstützen kann.

- 10 Zur Erhöhung der Stabilität und Spezifität von AS-ON und zur Verminderung der „non-AS“-Effekte können weitere chemische Modifikationen zum Einsatz kommen, z.B. Einbau von 2'-O-Methylribonukleotiden, Methylphosphonat-Segmenten, „locked nucleic acids“ (Methylenbrücke zwischen 2'-
- 15 Sauerstoff und 4'-Kohlenstoff der Ribose), Austausch des Cytosins durch 5'-Methylcytosin und/oder eine 2'-5'-Tetraadenylat-Modifizierung.

Dabei kann es sich sowohl um partiell modifizierte oder

20 vollständig via dieser chemischen Modifikation veränderte ON-Konstrukte handeln.

Ribozyme sind als katalytisch aktive RNA-Moleküle in der Lage, zelluläre RNA-Strukturen als Substrate zu erkennen

25 und sequenzspezifisch an einer Phosphordiesterbindung zu spalten. Die Erkennung erfolgt über AS-Arme, die aufgrund komplementärer Sequenzen eine Hybridisierung mit der Ziel-mRNA ermöglichen. Gegenüber AS-ON besitzen Ribozyme den grundsätzlichen Vorteil, dass ein Ribozym-Molekül als

30 echter Katalysator eine große Anzahl identischer Substratmoleküle umsetzen kann. Daher sind Ribozyme bereits

in wesentlich geringerer Konzentration als ON wirksam und führen darüber hinaus durch die Substrat-Spaltung zu einem irreversiblen RNA-Abbau [Sun et al.].

5 Unter den bisher bekannten Ribozymtypen ist das Hammerhead-Ribozym (Review: Birikh et al., 1997; Tanner, 1999) für derartige Anwendungen besonders interessant, weil es als vergleichsweise kleines Molekül (ca. 30-50 Nukleotide) bereits katalytisch aktiv sein kann. Ein sehr
10 wirksames trans-spaltendes Hammerhead-Ribozym besteht zum Beispiel aus lediglich 14 konservierten Nukleotiden in der katalytischen Domäne und zwei variablen Stammsequenzen (vorteilhafterweise aus jeweils 6-8 Nukleotiden), die durch Watson-Crick-Basenpaarung (analog der AS-ON) die
15 sequenzspezifische Erkennung des zu spaltenden Substrates realisieren und dieses anschließend durch Spaltung einer Phosphordiester-Bindung inaktivieren. In dieser Form lässt sich praktisch gegen jedes beliebige RNA-Molekül, welches eine potentielle Spaltstelle mit der minimalen
20 Sequenzanforderung -NUX- besitzt, ein spezifisch spaltendes Hammerhead-Ribozym konstruieren und somit beispielsweise zelluläre mRNA oder virale RNA inhibieren. Weitere katalytische Nukleinsäuren vom DNA-Typ (z.B. DNzyme) sind analog einsetzbar.

25

RNAi ("RNA interference") ist eine neue Methodik, die eine spezifische Geninhibition von Zielmolekülen auf mRNA-Ebene ermöglicht. Hierfür müssen doppelsträngige RNA-Moleküle („small interference RNA“, siRNA) mit ihren zwei
30 Nukleotiden langen 3'-Überhängen, bestehend bevorzugt aus Thymidin-Nukleotiden, in Zellen transfiziert werden.

Zunächst erfolgt eine Assoziation der siRNA-Konstrukte mit spezifischen zellulären Proteinen, gefolgt durch die Erkennung der Ziel-mRNA-Sequenz aufgrund der Komplementarität des AS-si-RNA-Stranges. Die intrinsische
5 Endonukleaseaktivität des Ribonukleoproteinkomplexes ermöglicht eine spezifische Degradation der zu inhibierenden mRNA.

In einer besonderen Ausführungsform der Erfindung ist das
10 AS-ON ein PS-ON bzw. ein mit weiteren chemischen Veränderungen modifiziertes Nukleinsäurekonstrukt.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist der Sequenzbereich der hTERT-mRNA, zu der das
15 Polynucleotid komplementär ist, ausgewählt aus der Gruppe umfassend 2183-2205, 2206-2225, 2315-2334, 2317-2336, 2324-2346, 2331-2350 und/oder 2333-2352.

Mit diesen Sequenzbereichen ist es vorteilhafterweise
20 möglich, die hTERT-Expression zu inhibieren. Durch die Inhibition können unter anderem Krankheiten, die mit der Expression dieses Gens assoziiert sind, unterdrückt werden, wie zum Beispiel Tumoren.

25 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist das Polynucleotid immobilisiert. Im Sinne der Erfindung werden unter Immobilisierung verschiedene Verfahren und Techniken zum Fixieren der Polynucleotide auf bestimmten Trägern verstanden. Die Immobilisierung kann beispielsweise
30 der Stabilisierung der Polynucleotide dienen, wodurch diese insbesondere bei Lagerung oder bei einmaligem Batch-Ansatz

durch biologische, chemische oder physikalische Einwirkungen in ihrer Aktivität nicht reduziert oder nachteilig modifiziert werden. Durch die Immobilisierung der Polynucleotide ist ein wiederholter Einsatz unter
5 technischen oder klinischen Routine-Bedingungen möglich; weiterhin kann die Probe mit den Polynucleotiden kontinuierlich umgesetzt werden. Dies kann insbesondere durch verschiedene Immobilisierungstechniken erreicht werden, wobei die Bindung der Polynucleotide an andere
10 Polynucleotide oder Moleküle bzw. an einen Träger so erfolgt, dass die dreidimensionale Struktur am aktiven Zentrum der entsprechenden Moleküle, insbesondere der Polynucleotide, nicht verändert wird. Vorteilhafterweise geht die Spezifität zu hTERT und die Spezifität der
15 eigentlichen Bindungsreaktion durch die Immobilisierung nicht verloren. Im Sinne der Erfindung können drei grundsätzliche Methoden zur Immobilisierung verwendet werden:

20 (i) Quervernetzung: Bei der Quervernetzung werden die Polynucleotide miteinander fixiert, ohne dass ihre Aktivität nachteilig beeinflusst wird. Sie sind vorteilhafterweise durch die Quervernetzung nicht mehr löslich.

25

(ii) Bindung an einen Träger: Die Bindung an einen Träger erfolgt zum Beispiel durch Adsorption, Ionenbindung oder kovalente Bindung. Dies kann auch innerhalb von mikrobiellen Zellen bzw. Liposomen oder anderen
30 membranhaltigen geschlossenen bzw. offenen Strukturen erfolgen. Das Polynucleotid wird durch die Fixierung

vorteilhafterweise nicht in seiner Aktivität beeinflusst. Es kann mit Vorteil zum Beispiel in der Klinik in Diagnose oder Therapie trägergebunden mehrfach oder kontinuierlich eingesetzt werden.

5

(iii) Einschluss: Der Einschluss erfolgt im Sinne der Erfindung insbesondere in eine semipermeable Membran in Form von Gelen, Fibrillen oder Fasern. Gekapselte Polynucleotide sind durch eine semipermeable Membran so
10 durch die umgebende Probenlösung getrennt, dass sie vorteilhafterweise noch mit der katalytischen Untereinheit der humanen Telomerase oder mit Fragmenten dieser interagieren können.

15 Für die Immobilisierung stehen verschiedene Verfahren zur Verfügung, wie beispielsweise die Adsorption an einen inerten oder elektrisch geladenen anorganischen oder organischen Träger. Solche Träger können beispielsweise poröse Gele, Aluminiumoxid, Betonid, Agarose, Stärke, Nylon
20 oder Polyacrylamid sein. Die Immobilisierung erfolgt hierbei durch physikalische Bindungskräfte, oft unter Beteiligung von hydrophoben Wechselwirkungen und ionischen Bindungen. Derartige Methoden sind vorteilhafterweise einfach zu handhaben und sie beeinflussen die Konformation
25 der Polynucleotide nur in geringem Umfang. Durch elektrostatische Bindungskräfte zwischen den geladenen Gruppen der Polynucleotide und dem Träger kann die Bindung vorteilhafterweise verbessert werden, zum Beispiel durch die Verwendung von Ionenaustauschern, wie zum Beispiel
30 Sephadex. Ein weiteres Verfahren ist die kovalente Bindung an Trägermaterialien. Die Träger können dazu reaktive

Gruppen aufweisen, die mit Aminosäure-Seitenketten homöopolare Bindungen eingehen. Geeignete Gruppen in Polynucleotiden sind Carboxy-, Hydroxy- und Sulfidgruppen und insbesondere die endständigen Aminogruppen von Lysinen.

5 Aromatische Gruppen bieten die Möglichkeit für Diazokupplungen. Die Oberfläche von mikroskopischen porösen Glaspartikeln kann durch Behandlung mit Silanen aktiviert und anschließend mit Polynucleotiden besetzt werden. Hydroxy-Gruppen natürlicher Polymere können zum Beispiel

10 mit Bromcyan aktiviert und anschließend mit Polynucleotiden gekoppelt werden. Mit Polyacrylamid-Harzen können zahlreiche Polynucleotide vorteilhafterweise direkte kovalente Bindungen eingehen. Bei dem Einschluss in dreidimensionale Netzwerke werden die Polynucleotide in

15 ionotrophe Gele oder andere dem Fachmann bekannte Strukturen eingeschlossen. Die Poren der Matrix sind insbesondere so beschaffen, dass die Polynucleotide zurückgehalten werden und eine Interaktion mit den Ziel-Molekülen möglich ist. Bei der Quervernetzung werden die

20 Polynucleotide durch Vernetzung mit bifunktionellen Agenzien in polymere Aggregate umgewandelt. Derartige Strukturen sind gelatinös und leicht verformbar und insbesondere für den Einsatz in verschiedenen Reaktoren geeignet. Durch Zugabe anderer inaktiver Komponenten, wie

25 zum Beispiel Gelatine, bei der Vernetzung können die mechanischen und enzymatischen Eigenschaften vorteilhafterweise verbessert werden. Bei der Mikroverkapselung wird der Reaktionsraum der Polynucleotide mit Hilfe von Membranen eingegrenzt. Die Mikroverkapselung

30 kann zum Beispiel als Grenzflächenpolymerisation durchgeführt werden. Durch die Immobilisierung bei der

Mikroverkapselung werden die Polynucleotide unlöslich und dadurch wiederverwendbar. Im Sinne der Erfindung sind immobilisierte Erkennungsmoleküle, insbesondere Polynucleotide alle Erkennungsmoleküle oder Polynucleotide, die sich in einem Zustand befinden, der ihre Wiederverwendung erlaubt. Die Einschränkung der Beweglichkeit und der Löslichkeit der Polynucleotide auf chemischem, biologischem oder physikalischem Wege führt vorteilhafterweise zu niedrigen Verfahrenskosten.

10

Die Erfindung betrifft auch eine pharmazeutische Zusammensetzung umfassend die erfindungsgemäßen Polynucleotide, gegebenenfalls in einer Kombination mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger. Dieser pharmazeutische Träger kann insbesondere zusätzliche Stoffe und Substanzen, wie beispielsweise medizinische und/oder pharmazeutisch-technische Hilfsstoffe, umfassen. Medizinische Hilfsstoffe sind beispielsweise solche Stoffe, die zur Produktion als Ingredienzien von pharmazeutischen Zusammensetzungen eingesetzt werden. Pharmazeutisch-technische Hilfsstoffe dienen der geeigneten Formulierung der pharmazeutischen Zusammensetzung oder des Arzneimittels und können sogar - sofern sie nur während des Herstellungsverfahrens benötigt werden - anschließend entfernt werden oder können als pharmazeutisch verträgliche Trägersubstanzen Teil der pharmazeutischen Zusammensetzung sein. Die pharmazeutische Zusammensetzung erfolgt gegebenenfalls in Kombination mit einem pharmazeutisch verträglichen Verdünnungsmittel. Hierbei kann es sich beispielsweise um phosphatgepufferte Kochsalzlösung, Wasser, Emulsionen, wie beispielsweise Öl/Wasser-

20
25
30

Emulsionen, verschiedene Arten von Detergenzien, sterile Lösungen und ähnliches handeln. Die Verabreichung der pharmazeutischen Zusammensetzung kann beispielsweise im Zusammenhang mit einer Gentherapie geschehen.

5

Im Sinne der Erfindung ist eine Gentherapie eine Behandlungsform unter Einsatz von natürlichen oder rekombinant veränderten Nukleinsäure-Konstrukten, einzelner Gensequenzen oder ganzer Gen- bzw. Chromosomenabschnitte
10 bzw. kodierter Transkriptbereiche, deren Derivate/Modifizierungen mit dem Ziel einer biologisch-basierten und selektiven Hemmung bzw. Revertierung der Krankheitssymptome und/oder deren kausalen Ursachen, wobei im speziellen Fall darunter die Inhibition eines im Verlauf einer Krankheit
15 überexprimierten Zielmoleküls auf Ebene der Nukleinsäuren, insbesondere auf der Transkriptebe-
ne, verstanden wird.

Die Gentherapie kann beispielsweise auch über geeignete Vektoren, wie beispielsweise virale Vektoren oder/und eine
20 Komplexierung mit Lipiden oder Dendrimeren erfolgen. Die Gentherapie kann insbesondere auch über die Verpackung in Proteinhüllen erfolgen. Weiterhin ist es möglich, dass das Polynucleotid mit einem weiteren Molekül fusioniert oder komplexiert ist, welches den gerichteten Transport zum
25 Zielort, die Aufnahme in und/oder die Verteilung innerhalb der Zielzelle unterstützt. Die Art der Dosierung und des Verabreichungsweges kann vom behandelnden Arzt entsprechend den klinischen Anforderungen bestimmt werden. Es ist dem Fachmann bekannt, dass die Art der Dosierung von
30 verschiedenen Faktoren abhängig ist, wie beispielsweise der Größe, der Körperoberfläche, dem Alter, dem Geschlecht oder

dem allgemeinen und krankheitsspezifischen Gesundheitszustand des Patienten, aber auch von dem speziellen Mittel, welches verabreicht wird, der Dauer und Art der Verabreichung und von anderen Medikamenten, die
5 möglicherweise parallel, insbesondere in einer Kombinationstherapie, verabreicht werden.

Die Erfindung betrifft auch einen Kit umfassend das Polynucleotid und/oder die pharmazeutische Zusammensetzung.
10 Weiterhin betrifft die Erfindung auch ein Array umfassend das Polynucleotid und/oder die pharmazeutische Zusammensetzung. Der Kit und der Array können zur Diagnose und/oder Therapie von Krankheiten eingesetzt werden, die mit der Funktion der katalytischen Untereinheit der humanen
15 Telomerase assoziiert sind. Die Erfindung betrifft auch die Verwendung des Polynucleotids, des Kits, des Arrays zur Diagnose, Prophylaxe, Verminderung, Therapie, Verlaufskontrolle und/oder Nachbehandlung von mit Zellwachstum, -differenzierung und/oder -teilung im
20 Zusammenhang stehenden Krankheiten.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist die mit Zellwachstum, -differenzierung und/oder -teilung im Zusammenhang stehende Krankheit ein Tumor. Besonders
25 bevorzugt ist der Tumor ein solider Tumor und/oder ein Blut- oder Lymphdrüsenkrebs.

Insbesondere kann es sich bei den Tumoren, die epithelialen oder mesodermalen Ursprungs sein können, im Sinne der
30 Erfindung um gut- oder bösartige Krebsarten der Organe der Lunge, der Prostata, der Harnblase, der Niere, der

Speiseröhre, des Magens, der Bauchspeicheldrüse (Pankreas), des Hirns, des Ovars, des Skelettsystems handeln, wobei besonders das Adenokarzinom der Brust, der Prostata, der Lunge und des Darms, Knochenmarkkrebs, das Melanom, das
5 Hepatom, die Kopf-Hals-Tumoren explizit als Vertreter bösartiger (so genannte maligne) Tumoren bevorzugt sind. Zur Gruppe der Blut- und Lymphdrüsenkrebsarten werden im Sinne der Erfindung alle Formen von Leukämien (z.B. in Zusammenhang mit B-Zellen-Leukämie, Gemischt-Zellen-
10 Leukämie, Nullzellen-Leukämie, T-Zellen-Leukämie, chronische T-Zellen-Leukämie, HTLV-II-assoziierte Leukämie, akute lymphatische Leukämie, chronisch-lymphatische Leukämie, Mastzell-Leukämie und myeloische Leukämie) und Lymphomen gezählt. Beispiele von mesenchymalen bösartigen
15 Tumoren (sogenannte Knochen- und Weichteilsarkome) sind: Fibrosarkom; das maligne Histiozytom; das Liposarkom; Hämangiosarkom; das Chondrosarkom und das Osteosarkom; Ewing-Sarkom; das Leio- und Rhabdomyosarkom, das Synovialsarkom; Karzinosarkom. Als weitere Tumorarten, die
20 im Sinne der Erfindung auch unter dem Begriff „Neoplasmen“ zusammengefasst werden, sind bevorzugt: Knochen-Neoplasmen, Brust-Neoplasmen, Neoplasmen des Verdauungssystems, colorektale Neoplasmen, Leber-Neoplasmen, Pankreas-Neoplasmen, Hirnanhang-Neoplasmen, Hoden-Neoplasmen,
25 Orbita-Neoplasmen, Neoplasmen des Kopfes und Halses, des Zentralnervensystems, Neoplasmen des Hörorgans, des Beckens, des Atmungstrakts und des Urogenitaltrakts).

In einer weiter bevorzugten Ausführungsform ist die
30 Krebserkrankung oder der Tumor, die/der behandelt oder verhindert wird, ausgewählt aus der Gruppe: Tumoren des

Hals-Nasen-Ohren-Bereichs umfassend Tumoren der inneren Nase, der Nasennebenhöhlen, des Nasopharynx, der Lippen, der Mundhöhle, des Oropharynx, des Larynx, des Hypopharynx, des Ohres, der Speicheldrüsen und Paragangliome, Tumoren

5 der Lunge umfassend nicht-kleinzellige Bronchialkarzinome, kleinzellige Bronchialkarzinome, Tumoren des Mediastinums, Tumoren des Gastrointestinaltraktes umfassend Tumoren des Ösophagus, des Magens, des Pankreas, der Leber, der Gallenblase und der Gallenwege, des Dünndarms, Kolon- und

10 Rektumkarzinome und Analkarzinome, Urogenitaltumoren umfassend Tumoren der Nieren, der Harnleiter, der Blase, der Prostata, der Harnröhre, des Penis und der Hoden, gynäkologische Tumoren umfassend Tumoren der Zervix, der Vagina, der Vulva, Korpuskarzinom, maligne

15 Trophoblastenerkrankung, Ovarialkarzinom, Tumoren des Eileiters (Tuba Fallopii), Tumoren der Bauchhöhle, Mammakarzinome, Tumoren endokriner Organe umfassend Tumoren der Schilddrüse, der Nebenschilddrüse, der Nebennierenrinde, endokrine Pankreastumoren,

20 Karzinoidtumoren und Karzinoidsyndrom, multiple endokrine Neoplasien, Knochen- und Weichteilsarkome, Mesotheliome, Hauttumoren, Melanome umfassend kutane und intraokulare Melanome, Tumoren des zentralen Nervensystems, Tumoren im Kindesalter umfassend Retinoblastom, Wilms Tumor,

25 Neurofibromatose, Neuroblastom, Ewing-Sarkom-Tumorfamilie, Rhabdomyosarkom, Lymphome umfassend Non-Hodgkin-Lymphome, kutane T-Zell-Lymphome, primäre Lymphome des zentralen Nervensystems, Morbus Hodgkin, Leukämien umfassend akute Leukämien, chronische myeloische und lymphatische

30 Leukämien, Plasmazell-Neoplasmen, myelodysplastische Syndrome, paraneoplastische Syndrome, Metastasen ohne

bekannten Primärtumor (CUP-Syndrom), peritoneale Karzinomastose, Immunsuppression-bedingte Malignität umfassend AIDS-bezogene Malignitäten wie Kaposi-Sarkom, AIDS-assoziierte Lymphome, AIDS-assoziierte Lymphome des zentralen Nervensystems, AIDS-assoziierten Morbus Hodgkin und AIDS-assoziierte anogenitale Tumoren, Transplantations-bedingte Malignitäten, metastasierte Tumoren umfassend Gehirnmetastasen, Lungenmetastasen, Lebermetastasen, Knochenmetastasen, pleurale und perikardiale Metastasen und maligne Aszites.

In einer besonderen Ausführungsform der Erfindung handelt es sich bei dem soliden Tumor um einen Tumor des Urogenitaltraktes und/oder des Gastrointestinaltraktes.

In einer weiteren besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist vorgesehen, dass der Tumor ein Kolonkarzinom, ein Magenkarzinom, ein Pankreaskarzinom, ein Dickdarmkrebs, ein Dünndarmkrebs, ein Ovarialkarzinom, ein Zervikalkarzinom, ein Lungenkrebs, ein Nierenzellkarzinom, ein Hirntumor, ein Kopf-Halstumor, ein Leberkarzinom und/oder eine Metastase dieser Tumoren/Karzinome ist.

In einer weiteren besonders bevorzugten Ausführungsform ist der solide Tumor ein Mamma-, Bronchial-, Kolorektal- und/oder Prostatakarzinom.

In einer ganz besonders bevorzugten Ausführungsform ist der Tumor des Urogenitaltraktes ein Harnblasenkarzinom (BCa). Das BCa stellt in der Bundesrepublik Deutschland die vierthäufigste Krebsform und siebthäufigste Krebstodes-

ursache bei Männern dar. Die TUR-B als generelle Primärtherapie des BCa erlaubt eine organerhaltende Entfernung von oberflächlichen Tumoren. Trotz dieser histopathologisch definierten vollständigen Entfernung des Tumors ist mit 50-70 % der Patienten ein relativ hoher Anteil innerhalb von zwei Jahren von einem Rezidiv betroffen [Stein et al.]. Ein Diagnose- sowie Therapieproblem stellt das synchrone oder metachrone multifokale Auftreten von Tumorherden dar, wodurch das Auftreten von Rezidiven entfernt von der resezierten Primärtumorlokalisation bedingt sein kann [Sidransky et al.]. Bei Auftreten eines Rezidivs oder bei primär als oberflächlich eingestuften Tumoren erfolgt in der Regel nach der TUR-B eine Langzeitprophylaxe mit einem Immun- (Bazillus Calmette-Guérin - BCG) oder Chemotherapeutikum (z. B. Mitomycin-C, Taxol, Gemcitabin/Cisplatin). Patienten mit muskelinvasiven BCa und mit entdifferenzierten, oberflächlichen Tumoren, die trotz dieser Therapie rezidivieren, werden in der Regel radikal zystektomiert bzw. unter Erhalt der Blase mittels Mono-/Polychemo-, Immun- oder Strahlentherapie bzw. Kombinationsverfahren dieser Methoden behandelt. Chemo-, Immun- oder Strahlenbehandlungen sind aufgrund ihrer relativ unspezifischen Wirkmechanismen von einer hohen therapieinduzierten Toxizität begleitet.

Aufgrund der gesundheitspolitischen Bedeutung des BCa (insbesondere in den westlichen Industrieländern), dem Fehlen tumorspezifischer Marker sowie der bekannten tumorbiologischen und zellulären Heterogenität des Tumors gibt es eine intensive Suche auf dem klinischen

Forschungsgebiet zum BCa, die insbesondere auf die Identifizierung neuer oder/und ergänzender Therapieoptionen zielen.

- 5 In einer besonderen Ausführungsform der Erfindung werden das Polynucleotid, die pharmazeutische Zusammensetzung, der Kit und/oder der Array für eine Verlaufskontrolle verwendet, die im Wesentlichen eine Überwachung der Wirksamkeit einer Antitumorbehandlung darstellt. Weiterhin
- 10 ist es bevorzugt, dass das Polynucleotid in einer Kombinationstherapie, insbesondere zur Behandlung von Tumoren, verwendet wird. Besonders bevorzugt ist hierbei, dass die Kombinationstherapie eine Chemotherapie, eine Zytostatikabehandlung und/oder eine Strahlentherapie
- 15 umfasst. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist die Kombinationstherapie eine adjuvante biologisch-spezifizierte Therapieform. Ganz besonders bevorzugt ist hierbei, dass diese Therapieform eine Immuntherapie ist. Weiterhin ist besonders bevorzugt, dass
- 20 die Kombinationstherapie eine Gentherapie und/oder eine Therapie mit einem Polynucleotid gegen dasselbe oder ein anderes Zielmolekül umfasst. Dem Fachmann sind verschiedene Kombinationstherapien, insbesondere zur Behandlung von Tumoren, bekannt. Es kann zum Beispiel vorgesehen sein,
- 25 dass innerhalb einer Kombinationstherapie eine Zytostatikabehandlung erfolgt oder beispielsweise eine Bestrahlung eines bestimmten Tumoreals, wobei diese Behandlung mit einer Gentherapie kombiniert wird, wobei das erfindungsgemäße Polynucleotid als Antikrebsmittel
- 30 eingesetzt wird. Das erfindungsgemäße Polynucleotid kann jedoch auch in Kombination mit anderen Polynucleotiden

gegen das selbe oder ein anderes Zielmolekül eingesetzt werden. Demgemäß kann es ganz besonders bevorzugt sein, dass das Polynucleotid zur Erhöhung der Sensitivität von Tumorzellen gegenüber Zytostatika und/oder Strahlen
5 verwendet wird. Weiterhin ist es bevorzugt, dass das Polynucleotid zur Hemmung der Vitalität, der Proliferationsrate von Zellen und/oder zur Induktion von Apoptose und eines Zellzyklus-Arrests verwendet wird.

10 Im Folgenden soll die Erfindung anhand von Beispielen näher erläutert werden, ohne auf diese Beispiele beschränkt zu sein.

Beispiel 1

15

Die gut transfizierbare humane Harnblasenkarzinom-Zelllinie EJ28 zeigte nach Transfektion insbesondere bei Verwendung von fünf spezifischen anti-hTERT-AS-Konstrukten (vgl. Tab. 2) eine unmittelbar einsetzende und kontinuierliche
20 Reduktion ihrer Viabilität um mehr als 65 % gegenüber der Nonsense (NS)-Kontrolle (Abb. 2). Dabei war die Beobachtung besonders auffällig, dass vier der wirksamsten Konstrukte gegen ein einzelnes mRNA-Sequenzmotiv gerichtet waren.

25 Bereits nach vier von fünf Behandlungen mit dem Konstrukt AStel2331-50' waren nahezu keine lebenden Zellen mehr im Kulturgefäß nachweisbar. Die Behandlung telomerasenegativer humaner Fibroblasten führte hingegen zu keinen signifikanten Unterschieden zwischen AS- und NS-ON-
30 behandelten Zellen, was eine Spezifität der AS-O-N-Wirkung auf die BCa-Zelllinie EJ28 indirekt belegt (Daten nicht

gezeigt). Die AS-spezifische Wirksamkeit wurde anschließend detailliert untersucht: in Übereinstimmung mit dem Viabilitätstest konnte in Bezug auf das Proliferations- und Zellkoloniebildungsverhalten (Abb. 3) ein Hemmeffekt dieser fünf AS-ON belegt werden. Zudem konnte die AS-spezifische Verringerung des Zellanteils in der DNA-Synthesephase (bis ca. 30 %) in Richtung einer G1-Arretierung nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Der Beweis für die AS-spezifische Wirkung der gegen die Zielmotive gerichteten AS-ON wurde in Form einer signifikanten und zeitabhängigen Reduktion der hTERT-Transkriptmenge erbracht (Abb. 4). In Übereinstimmung damit wurde auch die hTERT-Proteinexpression reprimiert. Außerdem wurde als Folge davon die Telomeraseaktivität der EJ28-Zellen um mehr als 60 % gehemmt (Daten nicht gezeigt).

Die AS-ODN spezifischen Effekte bezüglich einer Wachstums- und Proliferationsinhibierung wurden zudem für andere humane BCa-Zelllinien belegt (Kraemer et al.).

20 Beispiel 2

In Experimenten zur Wirkung von verschiedenen Chemotherapeutika (Mitomycin-C, Cisplatin, Gemcitabin) auf das Wachstumsverhalten von verschiedenen BCa-Zelllinien wurde unerwarteterweise ein signifikanter Verstärkungseffekt, bedingt durch die Zugabe einzelner Polynucleotide im Sinne der Erfindung, beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Am Beispiel der gut transfizierbaren BCa-Zelllinie 5637 konnte mit den AS-ON-Konstrukten AStel2206 und AStel2331 eine signifikante Steigerung der viabilitätsinhibitorischen Wirkung des Chemotherapeutikums

Cisplatin in zwei verschiedenen Dosierungen nachgewiesen werden (Abb. 5).

Tab. 2 hTERT-AS- und NS-ON: Nukleotid- und Zielsequenzen

5

Bezeichnung ¹	ss-Motiv ²	Sequenz ³ (5' → 3')
AS-ON		
ASel2206-2225	2191-2224	tgtcctgggggatggtgtcg
ASel2315-2334	2318-2346	ttgaaggccttgcggaactg
ASel2317-2336		tcttgaaggccttgcggaacg
ASel2331-2350		ggtagagacgtggctcttga
ASel2333-2352		aaggtagagacgtggctctt
NS-ON		
NS-K2	-	cagtctcagtactgaagctg
NS-K3		cagcttcagtactgagactg

¹ Der Name beinhaltet den Sequenzbereich der hTERT-mRNA (Acc. No.: AF015950), zu der das jeweilige AS-ON komplementär ist;

10 ² Die dargestellten Motive enthalten am 5'- und 3'-Terminus jeweils 10 nt doppelsträngige RNA;

³ Die fett gedruckten Nukleotide stellen den Bereich im AS-ON dar, der komplementär zur eigentlichen ss-Region des Zielmotivs ist.

15

Literaturverzeichnis

- 5 Agrawal S, Zhao Q: Antisense therapeutics. Curr Opin Chem Biol (1998) 2: 519-28.
- Beattie TL, Zhou W, Robinson MO, Harrington L: Reconstitution of human telomerase activity in vitro. Curr Biol (1998) 8: 177-80.
- 10 Boiziau C, Kurfurst R, Cazenave C, Roig V, Thuong NT, Toulme JJ: Inhibition of translation initiation by antisense oligonucleotides via an RNase-H independent mechanism. Nucleic Acids Res (1991) 19: 1113-9.
- 15 Crooke ST: Molecular mechanisms of action of antisense drugs. Biochim Biophys Acta (1999) 1489: 31-44.
- 20 Greider CW, Blackburn EH: Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. Cell (1985) 43: 405-13.
- Harley CB: Telomere loss: mitotic clock or genetic time bomb? Mutat Res (1991) 256: 271-82.
- 25 Ito H, Kyo S, Kanaya T, Takakura M, Inoue M, Namiki M: Expression of human telomerase subunits and correlation with telomerase activity in urothelial cancer. Clin Cancer Res (1998) 4: 1603-8.
- 30 Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, Coviello GM, Wright WE, Weinrich SL, Shay JW: Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. Science (1994) 266: 2011-5.
- 35

De Kok JB, Schalken JA, Aalders TW, Ruers TJ, Willems HL, Swinkels DW: Quantitative measurement of telomerase reverse transcriptase (hTERT) mRNA in urothelial cell carcinomas. Int J Cancer (2000) 87: 217-20.

5

Kole R, Sazani P: Antisense effects in the cell nucleus: modification of splicing. Curr Opin Mol Ther (2001) 3: 229-34.

10

Kraemer K, Fuessel S, Schmidt U, Kotzsch M, Schwenzer B, Wirth MP, Meys A: Antisense-mediated hTERT Inhibition Specifically Reduces the Growth of Human Bladder Cancer Cells. Clin Cancer Res (2003) 9: 3794-800.

15

Levy MZ, Allsopp RC, Futcher AB, Greider CW, Harley CB: Telomere end-replication problem and cell aging. J Mol Biol (1992) 225: 951-60.

20

Moser HE, Dervan PB: Sequence-specific cleavage of double helical DNA by triple helix formation. Science (1987) 238: 645-50.

25

Stein JP, Grossfeld GD, Ginsberg DA, Esrig D, Freeman JA, Figueroa AJ, Skinner DG, Cote RJ: Prognostic markers in bladder cancer: a contemporary review of the literature. J Urol (1998) 160: 645-59.

30

Sun LQ, Cairns MJ, Saravolac EG, Baker A, Gerlach WL: Catalytic nucleic acids: from lab to applications. Pharmacol Rev (2000) 52: 325-47.

Tamm I, Dorken B, Hartmann G: Antisense therapy in oncology: new hope for an old idea? Lancet (2001) 358: 489-97.

Patentansprüche

1. Polynucleotid gerichtet gegen ein Gen einer
5 katalytischen Untereinheit der humanen Telomerase,
dadurch gekennzeichnet, dass das Polynucleotid mit der
mRNA der katalytischen Untereinheit der humanen
Telomerase mindestens in zwei Zielsequenzbereichen
2176 bis 2250 und 2296 bis 2393 gemäß der Accession
10 number AF015950 spezifisch interagiert.
2. Polynucleotid nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet, dass das Polynucleotid mit den
Zielsequenzbereichen ausgewählt aus der Gruppe
15 umfassend 2183-2205, 2206-2225, 2315-2334, 2317-2336,
2324-2346, 2331-2350 und/oder 2333-2352 interagiert.
3. Polynucleotid nach einem der Ansprüche 1 und 2,
dadurch gekennzeichnet, dass der Sequenzbereich
20 und/oder das Polynucleotid durch Addition,
Amplifikation, Inversion, Missense-Mutation,
Nonsense-Mutation, Punktmutation, Deletion und/oder
Substitution modifiziert ist.
- 25 4. Polynucleotid nach einem der Ansprüche 1 bis 3,
dadurch gekennzeichnet, dass das Polynucleotid
immobilisiert ist.
5. Polynucleotid nach einem der Ansprüche 1 bis 4,
30 dadurch gekennzeichnet, dass das Polynucleotid ein
Nukleinsäurekonstrukt bzw. dessen Derivat ist.

6. Polynucleotid nach Anspruch 5,
dadurch gekennzeichnet, dass es mit einem weiteren
Molekül fusioniert oder komplexiert ist, welches den
gerichteten Transport zum Zielort, die Aufnahme in
und/oder die Verteilung innerhalb der Zielzelle
unterstützt.
7. Polynucleotid nach Anspruch 5 oder 6,
dadurch gekennzeichnet, dass das Nukleinsäurekonstrukt
ein Antisense-Oligonukleotid, ein DNazym, eine
Peptid-Nukleinsäure, ein Ribozym und/oder eine siRNA
ist.
8. Polynucleotid nach Anspruch 7,
dadurch gekennzeichnet, dass das Antisense-
Oligonukleotid durch Phosphothioatbindungen und/oder
andere chemische Modifikationen verändert ist.
9. Polynucleotid nach einem der Ansprüche 1 bis 8,
dadurch gekennzeichnet, dass der Sequenzbereich der
hTERT-mRNA, zu der das Polynucleotid komplementär ist,
aus der Gruppe umfassend 2183-2205, 2206-2225, 2315-
2334, 2317-2336, 2324-2346, 2331-2350 und/oder 2333-
2352 ausgewählt ist.
10. Pharmazeutische Zusammensetzung umfassend ein
Polynucleotid nach einem der Ansprüche 1 bis 9 allein
oder in Kombination mit einem pharmazeutisch
verträglichen Träger.

11. Kit umfassend ein Polynucleotid nach einem der Ansprüche 1 bis 9 und/oder eine pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 10.
- 5 12. Array umfassend ein Polynucleotid nach einem der Ansprüche 1 bis 9 und/oder eine pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 10.
- 10 13. Verwendung eines Polynucleotids nach einem der Ansprüche 1 bis 9, einer pharmazeutischen Zusammensetzung nach Anspruch 10, eines Kits nach Anspruch 11 und/oder eines Arrays nach Anspruch 12 zur Diagnose, Prophylaxe, Therapie, Verlaufskontrolle und/oder Nachbehandlung von mit Zellwachstum, -differenzierung und/oder -teilung im Zusammenhang stehenden Krankheiten.
- 15
14. Verwendung nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, dass die Krankheit ein Tumor ist.
- 20
15. Verwendung nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, dass der Tumor ein solider Tumor oder eine Leukämie ist.
- 25
16. Verwendung nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, dass der solide Tumor ein Tumor des Urogenitaltraktes und/oder des Gastrointestinaltraktes ist.
- 30
17. Verwendung nach Anspruch 14,

dadurch gekennzeichnet, dass der Tumor ein Kolonkarzinom, ein Magenkarzinom, ein Pankreaskarzinom, ein Dünndarmkrebs, ein Ovarialkarzinom, ein Zervikalkarzinom, ein Lungenkrebs, ein Nierenzellkarzinom, ein Hirntumor, ein Kopf-Halstumor, ein Leberkarzinom und/oder eine Metastase dieser Tumoren ist.

18. Verwendung nach Anspruch 15,
dadurch gekennzeichnet, dass der solide Tumor ein Mamma-, Bronchial-, Kolorektal- und/oder Prostatakarzinom und/oder eine Metastase dieser Tumoren ist.

19. Verwendung nach Anspruch 16,
dadurch gekennzeichnet, dass der Tumor des Urogenitaltraktes ein Harnblasenkarzinom und/oder eine Metastase dieser Tumoren ist.

20. Verwendung nach Anspruch 13,
dadurch gekennzeichnet, dass die Verlaufkontrolle eine Überwachung der Wirksamkeit einer Antitumorbehandlung ist.

21. Verwendung nach einem der Ansprüche 13 bis 20,
dadurch gekennzeichnet, dass das Polynucleotid in einer Kombinationstherapie verwendet wird.

22. Verwendung nach dem vorhergehenden Anspruch,
dadurch gekennzeichnet, dass die Kombinationstherapie eine Chemotherapie, eine Zytostatikabehandlung und/oder eine Strahlentherapie umfasst.

23. Verwendung nach dem vorhergehenden Anspruch,
dadurch gekennzeichnet, dass die Kombinationstherapie
eine adjuvante biologisch-spezifizierte Therapieform
5 umfasst.
24. Verwendung nach dem vorhergehenden Anspruch,
dadurch gekennzeichnet, dass die Therapieform eine
Immuntherapie ist.
10
25. Verwendung nach einem Ansprüche 21 bis 24,
dadurch gekennzeichnet, dass die Kombinationstherapie
eine Gentherapie und/oder eine Therapie mit einem
Polynucleotid gegen das selbe oder ein anderes
15 Zielmolekül umfasst.
26. Verwendung nach einem der Ansprüche 13 bis 25 zur
Erhöhung der Sensitivität von Tumorzellen gegenüber
Zytostatika und/oder Strahlen.
20
27. Verwendung eines Polynucleotids nach einem der
Ansprüche 1 bis 9 und/oder nach einem der Ansprüche 13
bis 26 zur Hemmung der Vitalität, der
Proliferationsrate von Zellen, zur Induktion von
25 Apoptose und/oder eines Zellzyklus-Arrests.

10/537449

1/5

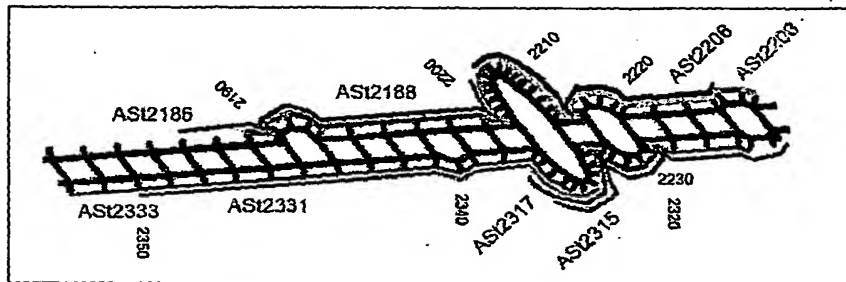


Abb. 1

AS-ODN gegen lokale Sekundärstrukturen der hTERT-mRNA

Dargestellt sind zwei gegenüberliegende ss-Strukturen (2201-14 und 2328-36 nt), gegen die jeweils vier AS-ODN gerichtet sind.

10/537449

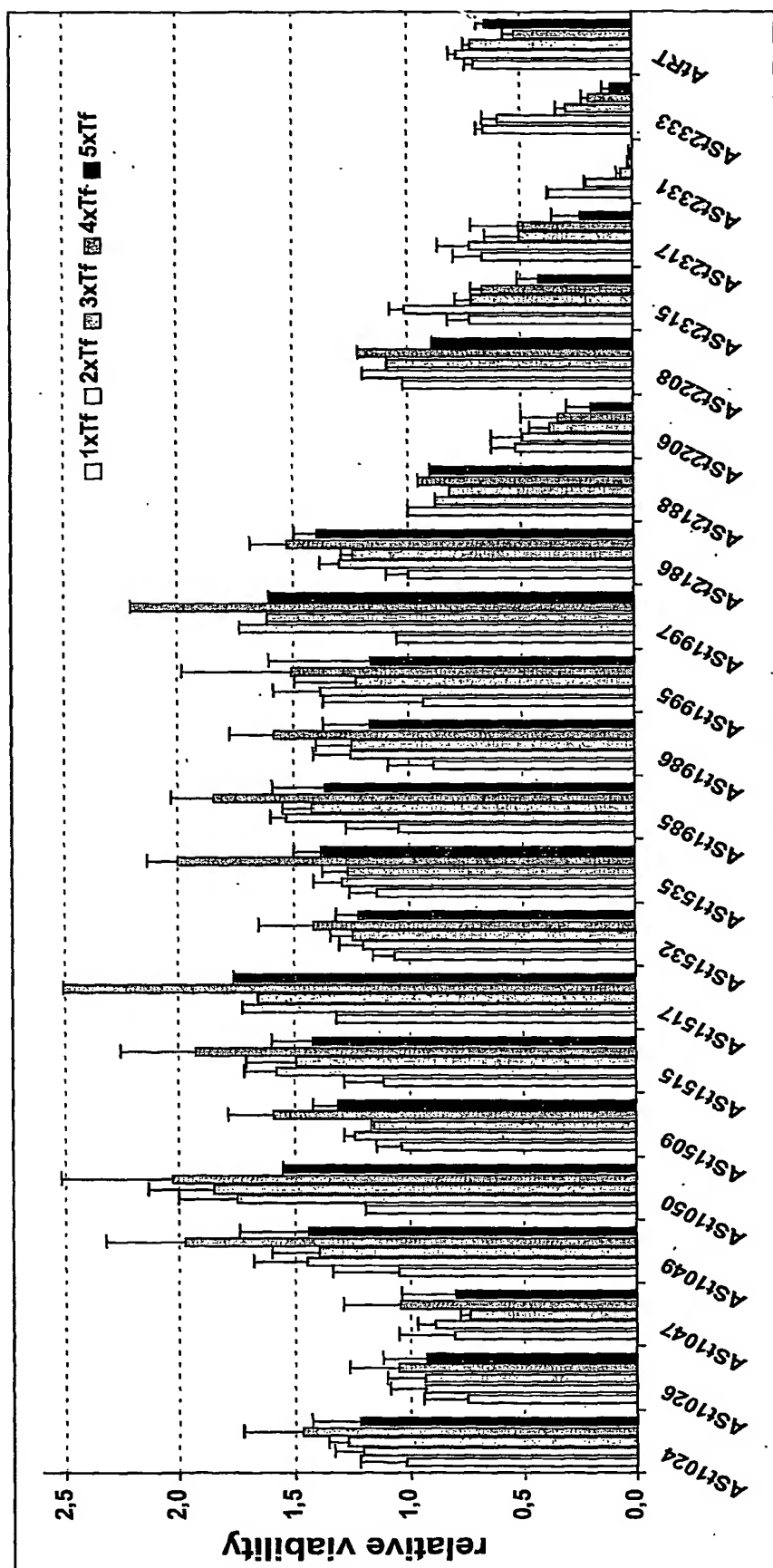


Abb. 2
Einfluss von multiplen Anti-hTERT-Behandlungen mit verschiedenen AS-ODN auf die Viabilität von EJ28-Zellen

10/537449

3/5

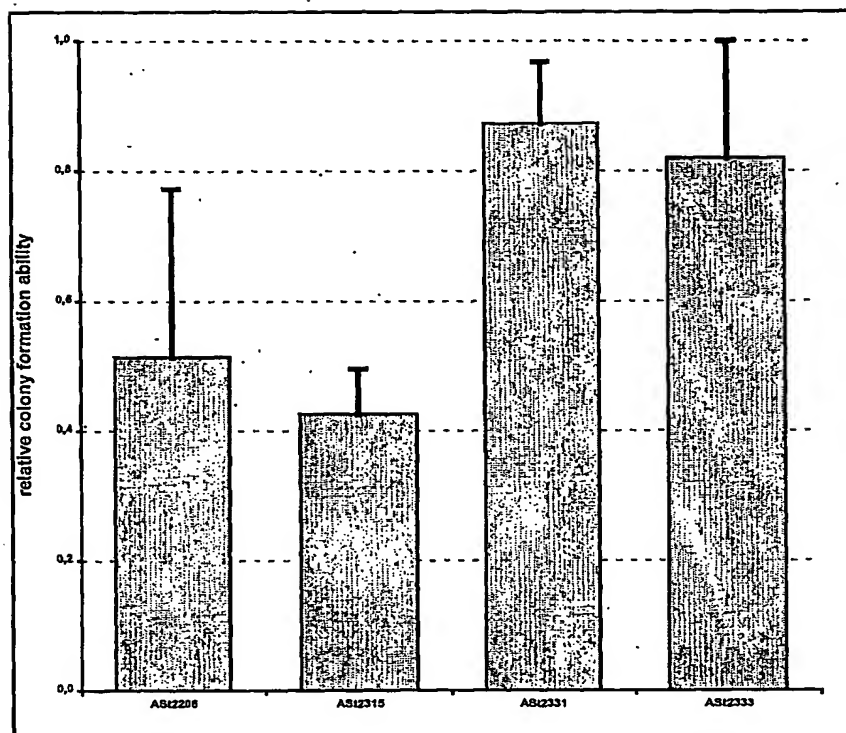


Abb. 3

Auswirkungen von zwei AS-ODN-Transfektionen auf das Koloniebildungsverhalten von EJ28-Zellen

10/537449

4/5

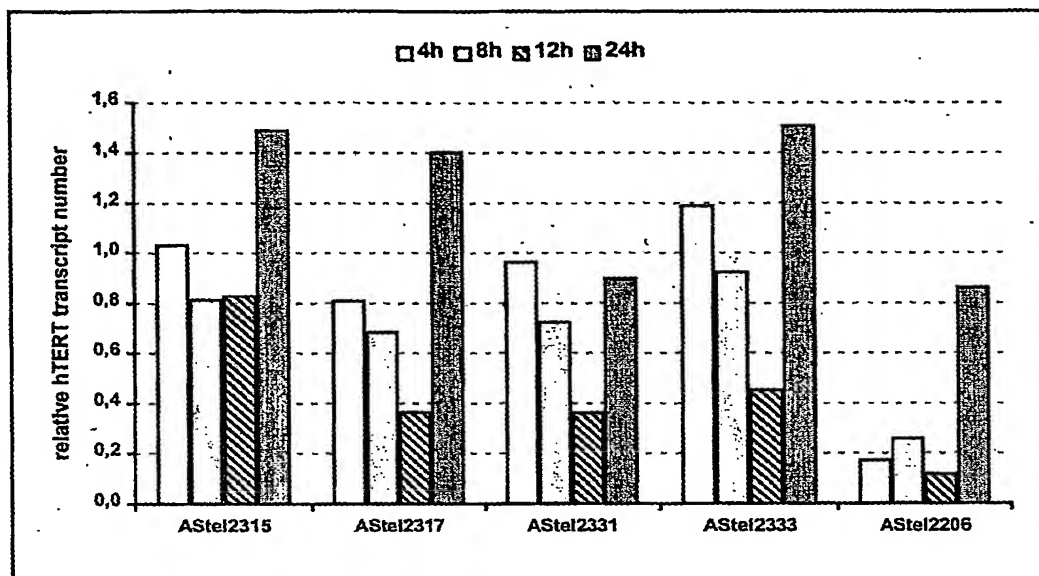


Abb. 4

Relatives Expressionsniveau AS-ODN behandelte EJ28-Zellen

10/537449

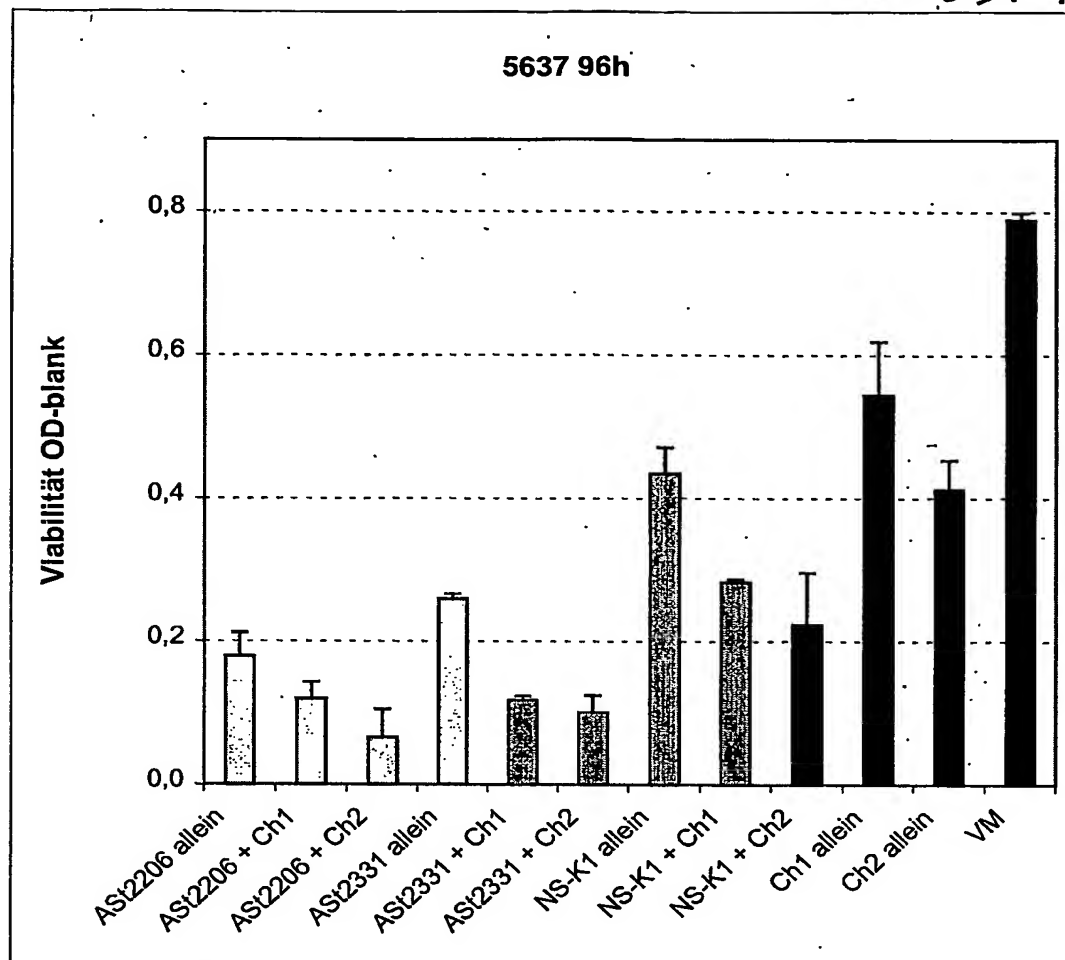


Abb. 5

Eine Kombinationsbehandlung der BCa-Zelllinie 5637 mit 0,5 (Ch1) bzw. 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Ch2) Cisplatin und 250nM AS-ODN zeigt eine signifikante Viabilitätsreduktion (WST-1 Test). Als Kontrolle wurden mit Nonsense (NS)-ODN behandelte sowie unbehandelte Zellen (VM) mitgeführt.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ BLACK BORDERS

☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☒ FADED TEXT OR DRAWING

☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.